



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08298982 A**(43) Date of publication of application: **19 . 11 . 96**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20**A23K 1/16****A61K 33/00****A61K 33/10****A61K 35/32****A61K 35/56****A61K 35/70****A61K 35/74****A61K 35/74****A61K 35/74****A61K 35/74****A61K 35/74**

**//(C12N 1/20 , C12R 1:125 , C12R
1:11 , C12R 1:23 , C12R 1:25 ,
C12R 1:24 , C12R 1:245 , C12R 1:46
, C12R 1:145 , C12R 1:865 , C12R
1:72)**

(21) Application number: **07108826**(71) Applicant: **AASU GIKEN:KK**(22) Date of filing: **02 . 05 . 95**(72) Inventor: **NAKANO MASUO**(54) **COMPLEX MICROBIAL PHARMACEUTICAL PREPARATION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a complex microbial pharmaceutical preparation having actions on reduction in malodor of livestock excreta, promotion, etc., of composting of the excreta by making specific 13 kinds of soil bacteria adsorbed on a substrate containing calcium and fermenting the resultant mixture.

CONSTITUTION: This complex microbial pharmaceutical preparation contains at least *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-298982

(43) 公開日 平成8年(1996)11月19日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20		8828-4B	C 1 2 N 1/20	E
A 2 3 K 1/16	3 0 4		A 2 3 K 1/16	3 0 4 B
A 6 1 K 33/00	ABU		A 6 1 K 33/00	ABU
33/10	ADP		33/10	ADP
35/32	ABA		35/32	ABA
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 20 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-108826

(22) 出願日 平成7年(1995)5月2日

(71) 出願人 595065024

株式会社アース技研

北海道帯広市西18条北1丁目17番地

(72) 発明者 中野 益男

北海道帯広市自由が丘5丁目2番地4

(74) 代理人 弁理士 田代 喬治 (外1名)

(54) 【発明の名称】 複合微生物製剤

(57) 【要約】

【目的】 血中コレステロール降下作用、整腸作用、免疫賦活作用、制癌作用、血圧降下作用、高血糖値の改善、精神障害原因物質の腸内発生抑制などの種々の生理作用に加えて、家畜の生産性の向上や糞便の悪臭消臭作用およびその堆肥化促進作用、反芻動物のルーメン（第1胃）内のメタン発生抑制作用などを有する新規な複合微生物製剤を提供する。

【構成】 バチルス属、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属、サッカロミセス属及びカンディダ属に属する少なくとも13種の特定の土壌細菌あるいはそれらに加えて硝化菌および硫黄細菌からなり、これら土壌細菌をカルシウム含有基材に吸着発酵させた製剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも、バチルス・スプチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットー (*Bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) からなる微生物群とそれら微生物群を吸着している基材からなり、該基材が少なくともカルシウム含有基材を含んでおり、該カルシウム含有基材のカルシウム成分の少なくとも一部が該微生物群の作用により生体適合型有機カルシウム化合物を構成していることを特徴とする複合微生物製剤。

【請求項2】 微生物群が更に硝化菌および硫黄細菌を含む請求項1記載の製剤。

【請求項3】 カルシウム含有基材が、骨粉、貝化石、合成アパタイト、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムから選ばれる少なくとも1種を含有している請求項1または2記載の製剤。

【請求項4】 少なくとも、バチルス・スプチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットー (*Bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) をそれぞれ液体純粋培養した後、得られる各微生物培養物をカルシウム含有基材と混合し、得られる混合物を発酵させることからなる請求項1記載の複合微生物製剤の製造方法。

【請求項5】 純粋培養する微生物として更に硝化菌および硫黄細菌を含む請求項4記載の製造方法。

【請求項6】 カルシウム含有基材が、骨粉、貝化石、珊瑚、合成アパタイト、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムから選ばれる少なくとも1種を含有している請求項

4または5記載の製造方法。

【請求項7】 少なくとも、バチルス・スプチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットー (*Bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) からなる混合微生物群を、少なくともカルシウム含有基材を含む吸着基材と混合し培養することからなる請求項1記載の複合微生物製剤の製造方法。

【請求項8】 微生物群が更に硝化菌および硫黄細菌を含む請求項7記載の製造方法。

【請求項9】 カルシウム含有基材が、骨粉、貝化石、珊瑚、合成アパタイト、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムから選ばれる少なくとも1種を含有している請求項7または8記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血中コレステロール降下作用、整腸作用、免疫賦活作用、制癌作用、血圧降下作用、高血糖値の低減正常化、精神障害原因物質の腸内発生抑制などの種々の生理作用に加えて、糞便の悪臭消臭作用およびその堆肥化促進作用、反芻動物のルーメン（第1胃）内のメタン発生抑制作用などを有する新規な複合微生物製剤に関する。更に詳しくは、少なくともある特定の13種の土壌細菌をカルシウム含有基材に吸着発酵させた複合微生物製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 家畜糞は生物循環の流れに沿い、作物収穫物残渣等とともに堆肥化し、有機質肥料として土壤還元されている。しかし、堆肥化の際にメタンや悪臭物質が発生し、それらが地球温暖化や悪臭公害の元凶として問題になっている。メタンは反芻家畜動物の第1胃（ルーメン）からも多く発生し、これらが地球大気温暖化の原因として注目されており、糞尿の悪臭と共に畜産公害の源として問題となっている。また、未完熟堆肥の河川への流亡が水質汚染問題として注目されている。このような状況において、家畜糞尿の堆肥化を促進し、悪臭の発生を抑える目的で種々の微生物・酵素含有資材が開発されている。例えば、特開昭55-48386号には新規な微生物および糞便脱臭剤としてチオバシラス属又はシュードモナス属に属する微生物が開示されている。

また、特開昭59-179063号には亜硝酸菌、緑色イオウ細菌、セルロース分解菌、糸状菌、放線菌などからなる混合土壌細菌を米ぬか、オガクズなどと混合発酵させた消臭剤とその製法が開示されている。この混合土壌細菌は、直接糞便、生ゴミなどの悪臭源に施用する他、飼料に混合して家畜に給与することによって糞便の悪臭を予防することが開示されている。

【0003】微生物は、一方では家畜の発育促進、下痢の予防・治療を目的として生菌入り飼料として家畜に給与されている。例えば、特開昭60-224451号には、無機セレン含有培地で増殖した微生物菌体を含む飼料組成物が開示されている。また、特開昭63-63620号には、乳酸菌、糖化菌、酪酸菌を有効成分とする整腸剤が開示されている。また、特開平1-23858号には、バチルス・セレウスの栄養孢子からなり成長改善効果のある動物用飼料が開示されている。

【0004】上記の微生物資材の他にも、数多くの商品が市販されているが、これら商品の効果と安全性についての評価は定まっておらず、中には科学的裏付けの不明瞭なものもある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者も、農畜産廃棄物の有機質肥料化の促進と畜産公害や病虫害を防止するために微生物・酵素類の入った飼料添加物、中でも発酵飼料を開発すべく鋭意研究を重ねた結果、土壌中に存在する微生物のうち、ある特定のセルロース分解菌、糸状菌、放線菌、酵母、硝化細菌、硫黄細菌などを純粋培養し、有機質基材に混合し再発酵させて固定したものを飼料に加えて給与すると、家畜の腸内細菌が安定化し生産性が向上するだけでなく、家畜糞尿の悪臭が低減し、糞尿の堆肥化が促進され、また、その堆肥を土壌に還元すると土壌中の植物病原性糸状菌の増殖を抑え病虫害を防止することが認められた。また、反芻動物に給与するとルーメン（第1胃）内におけるメタン発生を抑制することが認められた。更に、生理作用について究明すべく調べた結果、意外にも前述の種々の生理作用を示すことも発見した。また、これらの効果と構成微生物との関係を究明すべく更に研究を行ったところ、上記の効果は構成微生物単独では顕著には得られず、複合微生物にして初めて相乗効果が得られることを発見した。

【0006】更に、本発明者は、この発酵飼料の効果を最大限に保持しながら大量に製造する方法について確立するため鋭意研究を重ねた結果、各構成微生物の培養物を基材に混合し発酵する際に、ある種のカルシウム含有基材を用いて発酵させることによりこの目的が達成できるだけでなく、意外にも上記の効果が増強されることを発見した。本発明はこれらの知見を基にして完成した。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、少なくとも、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)、

バチルス・ナットー (*bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) からなる微生物群とそれら微生物群を吸着している基材からなり、該基材が少なくともカルシウム含有基材を含んでおり、該カルシウム含有基材のカルシウム成分の少なくとも一部が該微生物群の作用により生体適合型有機カルシウム化合物を構成していることを特徴とする複合微生物製剤が提供される。

【0008】本発明で使用する微生物群は、土壌中に存在するものであって特殊なものではなく一般に試験研究などでよく使用されるものであり、また、上記の種類のものであればよく菌株については特に限定されない。従って、市販の菌株または微生物寄託機関、微生物保存機関から当業者が容易に入手できるものを使用することができる。例えば、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) については、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (以下、ATCC) に寄託している ATCC 6051 株、ATCC 6633 株などが使用できる。バチルス・ナットー (*bacillus natto*) については、ATCC 15245 株やインスティテュート・オブ・ファーマメンテーション、オオサカ (Institute for Fermentation, Osaka) (以下、IFO) に保存されている IFO 3336 株などが使用できる。バチルス・メガテリウム (*bacillus megaterium*) については、ATCC 14581 株や ATCC 14945 株などが使用できる。ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) については、ATCC 4356 株、ATCC 11506 株、IFO 3205 株及びドイツ・サミュエル・フォン・ミクロオルガニズメン (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) (以下、DSM) に保存されている DSM 20077 株などが使用できる。ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) については、ATCC 8014 株、ATCC 14917 株、DSM 20314 株などが使用できる。ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) については、ATCC 14869 株、IFO 12520 株、AHU 1508 株 (AHU は、北海道大学農学部: Faculty of Agriculture, Hokkaido University の略号) などが使用できる。ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) については、

ATCC393株、DSM20021株などが使用できる。ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*) については、ATCC14429株、ATCC19433株などが使用できる。ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*) については、ATCC19435株、IFO12546株などが使用できる。ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) については、ATCC19258株、IFO3863株などが使用できる。クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) については、ATCC19398株、IFO3852株などが使用できる。サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) については、ATCC7752株、IFO0216株などが使用できる。カンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) については、ATCC9256株、IFO0396株などが使用できる。

【0009】これらの微生物の他に、悪臭物質の発生を低減する目的で硝化菌および硫黄細菌を加えることもできる。硝化菌とは、アンモニアまたは亜硝酸をそれぞれ亜硝酸または硝酸へと酸化することができる細菌であり、本発明に使用できる硝化菌としては、例えばニトロソモナス・オイロパエ (*Nitrosomonas europaea*)、ニトロバクター・ウイノグラディスキー (*Nitrobacter winogradskyi*) などが使用できる。一方、硫黄細菌とは、硫黄または無機硫黄化合物を酸化しエネルギー生産する細菌であり、本発明に使用できる硫黄細菌としては、例えば スルフォロバス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) などが使用できる。これらの細菌に関しては特に菌株についての限定はなく、当業者が通常入手できるものを使用できる。例えば、ニトロソモナス・オイロパエ (*Nitrosomonas europaea*) については、ATCC25978株などが使用できる。ニトロバクター・ウイノグラディスキー (*Nitrobacter winogradskyi*) については、ATCC25391株などが使用できる。また、硫黄細菌については、ATCC33909株などが使用できる。

【0010】なお、堆肥発酵などにおいて高温時にも発酵を促す目的で耐熱性バチルス属細菌を加えることも可能であり、例えば、バチルス・サーモフィラス (*Bacillus thermophilus*) を使用することができる。バチルス・サーモフィラス (*Bacillus thermophilus*) については、シャープら (R. Sharp, M. Munster, T. Atkinson (PHLS Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury); A. Vivian (Bristol Polytechnic, Bristol); S. Ahmad (Trent Polytechnic, Nottingham), 英国) が、マイクロバクテリアロジー・エキストリーム エンバイアロメント・イツ ポテンシャル バイオテクノロジー (Microbiology. Extreme Environ. Its Potential Biotechnol.)、第62~81頁、1989年 (表題: バチルス・サーモフィラスの分類学的及び遺伝学的研究 (Taxonomic and ge

netic studies of *Bacillus thermophilus*)、ヨーロッパ微生物学会シンポジウム連盟、トロイア)に記載している菌株が使用できる。

【0011】本発明の複合微生物製剤に上記の微生物が構成成分として含まれていることは、以下の方法によって同定できる。すなわち、バチルス・スプチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットー (*Bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) の場合は、PEES寒天培地 (栄研化学 (株) 製: 酵母エキス2.5g、ペプトン10g、ゼラチン30g、乳糖2g、マンニット10g、塩化ナトリウム75g、リン酸二カリウム5g、寒天15g、水1000ml) を使用して単離する。ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブリス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) の場合は、LBS選択寒天培地 (Becton Dickinson Co. Ltd., (BBL) 製 (米国): Lab-lemco powder (Oxoid) 8g、トリプチケース・ペプトン10g、酵母エキス5g、 KH_2PO_4 6g、クエン酸アンモニウム2g、ブドウ糖20g、ソルビタンモノオレイト1g、酢酸ナトリウム25g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 34mg、寒天15g、水1000ml) で単離する。ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) の場合は、KFストレプトコッカス (*Streptococcal*) 寒天培地 (BBL: ポリペプトン10g、酵母エキス10g、塩化ナトリウム5g、グリセロリン酸ナトリウム10g、マルトース20g、乳糖1g、窒化ナトリウム0.4g、寒天20g、水1000ml) で単離する。クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) の場合は、NNクロストリジウム選択寒天培地 (ペプトン40g、 Na_2HPO_4 5g、 KH_2PO_4 1g、塩化ナトリウム2g、 MgSO_4 0.1g、ブドウ糖2g、寒天25g、50%卵黄溶液100ml、2%硫酸ネオマイシン10ml、水1000ml) で単離する。サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) の場合は、ポテトデキストロース (PD) 寒天培地 (ポテトインフュージョン Poteto infusion) 200g、ブドウ糖20g、寒天15g、水1000ml) で単離する。培養条件は、各微生物によって異なるが、ストレプトコッカス属細菌、バチルス属細菌、サッカロミセス属菌およびカンディダ属菌は好氣的条件下で、ラクトバチルス属細菌およびクロストリジウム属細菌は嫌氣的条件下、37℃で12~24時間培養を行う。それぞれ本発明の複合微生物製剤から分離培養後、ミニテック細菌同定システム (Be

eton Dickinson Co.Ltd., (BBL)製、米国)、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版、駒形和男編: 微生物分類実験法、学会出版センター刊 (1982年) および中野益男: 化学と生物、第18巻、第15~24頁、学会出版センター発行 (1980年) に記載の細胞膜化学構造による化学分類法および顕微鏡観察により同定できる。

【0012】硝化細菌の分離については以下のようにして行うことができる。ニトロソモナス属細菌の場合は硝化細菌選択分離培地として、A液 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 11.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4g および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g を蒸留水100ml に溶解したもの] およびB液 (KH_2PO_4 1.36g を蒸留水100ml に溶解したもの) を9:1の割合 (容量比) で混合し、0.1N NaOH溶液でpH8.0~8.2に調整した培地を用いて培養後、シリカゲル平板上でコロニーを分離し、上記のバージェイズ・マニュアルに従って同定することができる。また、ニトロバクター属細菌の場合は、A液として KNO_3 2.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4g および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g を蒸留水100ml に溶解したものをを用いる以外は、ニトロソモナス属細菌と同じ方法で同定できる。一方、硫黄細菌の分離については、DSM120変法培地 (KH_2PO_4 0.227g、 K_2HPO_4 0.348g、 NaCl 2.25g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.09mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg、 CoSO_4 0.6mg、 ZnSO_4 0.3mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03mg、 H_3BO_3 0.9mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.091mg、 NiCl_2 0.06mg、 NaHCO_3 0.85g、システイン塩酸塩 0.3g、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.3g、酵母エキス2g、ビタミン溶液 (ビオチン2mg、葉酸2mg、ピリドキシン塩酸塩10mg、チアミン塩酸塩5mg、リボフラビン5mg、ナイアシン5mg、DL-カルシウムパントテン酸5mg、ビタミン B_{12} 0.1mg、p-アミノベンゾイック酸5mg、リボ酸5mg を蒸留水1000ml) 10ml、レサズリン (Resazurin) 1mg を蒸留水1000ml に溶解したもの) を分離培地として用いて40~45℃で4~6週間集積培養した後、上記のバージェイズ・マニュアルに従い同定することができる。

【0013】本発明の製剤は、上記の微生物群が少なくともカルシウム含有基材を含む基材に吸着されている。カルシウム含有基材とは、主成分としてカルシウムを含むものであればよく、無機物であってもよい有機物であってもよい。カルシウム含有量は、25重量%以上含むものがよく、好ましくは25~80重量%含むものが適している。このカルシウム含有基材が、全基材のう

ち、カルシウム含量として25重量%以上になるように使用する。25重量%未満では後述する生体適合型有機カルシウム化合物の構成率が小さくなるので好ましくない。カルシウム含有基材の具体例としては、獣骨や魚骨などの焼骨粉、貝化石、珊瑚、合成アパタイト、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられるが、これに限定されるものではなく、その他のカルシウム含有基材もカルシウム含量が25重量%以上のものであれば制限無く使用できる。これらのカルシウム含有基材は1種類を使用してもよく、また複数種を混合使用してもよい。本発明で使用するカルシウム含有基材は粉末状などの固体でもよいし、溶媒に溶解した液状のものでもよい。本発明では、カルシウム含有基材を他の基材と併用することもできる。例えば、キチンまたはその誘導体、アルギン酸、セルロースや、飼料用基材として使用される米ぬか、ふすま、大豆粕、オカラなどと混合して使用することができる。

【0014】本発明では、カルシウム含有基材のカルシウム成分の少なくとも一部が微生物群の作用により生体に吸収されやすい生体適合型有機カルシウム化合物を構成している。生体適合型有機カルシウム化合物とは、乳酸カルシウム、フマル酸カルシウム、リンゴ酸カルシウムやクエン酸カルシウムなどの有機酸カルシウム、あるいはカルシウム結合蛋白のカゼインホスホペプチドなどのペプチド-カルシウム化合物などが挙げられる。これらは、上記のカルシウム含有基材そのものにはほとんど存在しないが、本発明で使用する微生物群の作用によりそのカルシウムの少なくとも一部がこのような生体適合型有機カルシウム化合物に変換されることにより存在するものである。本発明の製剤が、この生体適合型有機カルシウム化合物を含有していることは、これらの有機化合物を分析することにより確認できる。例えば、ビューレンら (Rolf H.O. Buhlen and Jeremias H.R. Kagi: FEBS Letters, 39(2), 229-233 (1974)) に記載の方法に参照した方法で分析同定することができる。詳細には、試料を10mM トリス塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液 (pH8.6) に懸濁して抽出し、遠心分離により上清を得、これをセファデックスG-25又はG-75カラム、及びDEAE-セファデックスA-25カラムを使用し、10mM トリス塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液でゲルろ過して分画する。各画分のCa、Mg等のミネラルは原子吸光法で分析し、有機酸はガスクロマトグラフィーで分析して有機カルシウムの存在を同定することができる。しかしながら、単に微生物群に上記のような有機酸カルシウムを混合しただけでは微生物群の作用を増強する効果は十分ではなく、カルシウム含有基材を微生物群とともに発酵させることにより本発明の複合微生物がもたらす効果をより顕著に向上し種々の生理活性を示すことから、ここでいう生体適合型有機カルシウム化合物とは、カルシウムと微生物群とが複合体を形成したものと考えられる。

【0015】本発明の製剤は、上記の微生物群及びその吸着基材の合計重量1g当たり、上記の微生物群の各菌株の菌数がそれぞれ 10^4 cfu (コロニー形成単位)以上、好ましくは 10^6 cfu 含有する。 10^4 cfu /gよりも少ないと所望の効果が顕著に現れない。

【0016】本発明は、上記複合微生物製剤の製造方法も提供する。製造方法としては、各構成微生物をそれぞれ純粋培養した後、それらを吸着基材と混合し発酵させる方法と、構成微生物群を最初から吸着基材と混合して培養する方法の2種類が考えられる。

【0017】即ち、本発明によれば、少なくとも、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットー (*bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) をそれぞれ液体純粋培養した後、得られる各微生物培養物をカルシウム含有基材と混合し、得られる混合物を発酵させることからなる前記複合微生物製剤の製造方法が提供される。

【0018】更にまた、本発明によれば、少なくとも、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・ナットー (*bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) からなる混合微生物群を、少なくともカルシウム含有基材を含む吸着基材と混合し培養することからなる前記複合微生物製剤の製造方法が提供される。

【0019】前者の方法について具体的に説明すると、第1の工程として本発明の複合微生物の構成微生物をそれぞれ液体純粋培養する。各微生物の培養用液体培地については特に限定されないが、通常、ストレプトコッカ

ス属細菌、バチルス属細菌、ラクトバチルス属細菌、サッカロミセス属菌およびカンディダ属菌は好氣的条件下で、また、クロストリジウム属細菌は嫌氣的条件下で、ニュートリエントブロス (Nutrient broth) 培地 (BBL: グリセートペプトン5g、牛肉エキス3g、水1000ml) とDSM1ブロス (DSM 1 broth) 培地 (K_2HPO_4 1.4g、 KH_2PO_4 4g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 160mg、 $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 80mg、 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 8mg、クエン酸水素二アンモニウム4g、酢酸ナトリウム4g、肉ペプトン20g、酵母エキス5g、ブドウ糖30g、蒸留水1000ml) を用いて、37℃で対数増殖期まで培養を行う。通常7~14時間で対数増殖期に達する。

【0020】また、硝化菌および硫黄細菌を微生物群に加える場合は、その液体純粋培養を以下のようにして行う。即ち、ニトロソモナス属細菌の場合は (NH_4)₂SO₄ 0.5g、 KH_2PO_4 0.07g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g および $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05g を蒸留水1000mlに溶解したものを5%Na₂CO₃ 溶液でpH8.0に調整した培地を硝化菌培養培地として用いて培養することができる。また、ニトロバクター属細菌の場合は、(NH_4)₂SO₄ 0.5gの代わりにKNO₃ 0.2gを使用する以外はニトロソモナス属細菌で使用した培地と同じ培地を用い同じ培養条件で培養することができる。培養条件はいずれも嫌氣条件下37℃で培養することができる。また、硫黄細菌の場合は、前記DSM120変法培地を用いて40~45℃で大量純粋培養することができる。

【0021】硝化菌及び硫黄細菌を培養する培地としては、ATCC寄託細菌を使用する場合はATCC寄託リストに記載されている培地を使用することができる。具体的には、ニトロソモナス・オイロバエの場合はATCC1573培地を、ニトロバクター・ウイノグラディスキーの場合はATCC480培地を、スルフォロバス・アシドカルダリウスの場合はATCC1723培地をそれぞれ使用することができる。

【0022】得られた各微生物の純粋培養物から連続遠心によりそれぞれ集菌しリン酸緩衝液で洗浄し凍結乾燥する。

【0023】第2の工程として、殺菌した100メッシュの米ヌカ粉体1kgに対し、凍結乾燥した各菌体2~5mgを後述のミネラル水1mlにそれぞれ懸濁したものを接種し、これに後述の酵素液2重量%、蔗糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で24~48時間好氣的条件下で静置発酵する。ミネラル水としては、 K_2HPO_4 1.4g、 KH_2PO_4 4g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 160mg、 $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 80mg、 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 8mg を水1000mlに溶解したものを使用する

ことができる。また酵素液としては、以下のようにして調製したものを使用できる。すなわち、自然乾燥を充分にした生大豆を粗砕する。この生大豆粗砕粉の重量比30%に対し、米糠を70%加え攪拌混合し、この混合物1kgに対し、20重量% Na_2CO_3 溶液1000mlを加えよく攪拌し、湿度80%、温度40~50℃の条件下で5日間発酵させる。その後、これを煮沸釜に移して、この原料1kgに対し、ミネラル水2000ml、粗製ブドウ糖（たとえば、廃糖蜜など）100g（10%濃度）を加えて攪拌しながら徐々に加熱し、煮沸、沸騰させる。この間液面の浮遊物はすべて除去する。沸騰後約1時間煮沸した後、加熱を停止し自然放冷により室温まで冷却した後、遠心分離機にかけ、上清をろ過して黄褐色の透明液を酵素液として得る。

【0024】静置発酵により発酵温度が60~70℃まで上昇した後、培養物を攪拌し、以後24時間毎に攪拌して5日間培養し元菌とする。この元菌1kgに対しカルシウム含有基材を含む基材60kgを混合し、前述の酵素液2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で24時間静置発酵させる。発酵終了後攪拌し、6~12時間さらに発酵させ、発酵温度が5 * (培地組成)

(A) 培地 (1リットル蒸留水中)

肉ペプトン	10 g
酵母エキス	5 g
NH_4Cl	2 g
K_2HPO_4	7 g
KH_2PO_4	3 g
クエン酸ナトリウム・ $2\text{H}_2\text{O}$	1 g

(B) 培地 (20ml蒸留水中)

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.08 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
グルコース	15 g

(A) 培地及び(B) 培地をオートクレーブ滅菌後混合する。

【0028】培養条件は限定的ではないが通常20~30℃で24時間培養した後、同じ培地でスケールアップしてさらに20~30℃で培養することによって増殖することができる。培養は通常通性嫌気性条件下で行う。得られた培養物から連続遠心により集菌し、前記と同様の方法でミネラル水1mlに懸濁し、これを米ヌカ粉体1kgに接種し、これに前記の酵素液2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で24~48時間好気条件下で静置発酵する。発酵温度が60~70℃まで上昇した後攪拌し、以後24時間毎に攪拌して5日間培養する。この培養物1kgに対しカルシウム含有基材を含む基材60kgを混合し、前述の酵素液

* 5~65℃に上昇してから水分12%以下に低温冷風乾燥して本発明の複合微生物製剤が得られる。上記の方法で通常、各微生物の最終菌数は 10^4 生菌数(cfu)/g以上、好ましくは 10^{6-8} cfu/gになる。必要に応じて、それぞれ上記元菌の調製方法で純粋培養された各構成微生物を発酵終了微生物に混合することによって、すべての微生物の菌数がそれぞれ上記の範囲になるように調整してもよい。

【0025】後者の方法では、前記の13種、またはこれらと前記の硝化菌及び硫黄細菌を含む微生物群を最初から混合したものを吸着基材と共に培養する方法である。微生物群としては、例えば、発明者が腐植土及び自然湖底質から分離・継代して保有する混合微生物（識別のための表示：EG）（工業技術院生命工学工業技術研究所の寄託拒否により自己寄託）を使用することができる。

【0026】培養は、通常表1に示す培地を用いて行うことができるが、より効率的に培養するためには前述の酵素液を使用することが好ましい。

【0027】

【表1】

2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で24時間静置発酵させる。発酵終了後攪拌し、6~12時間さらに発酵させ、発酵温度が55~65℃に上昇してから水分12%以下に低温冷風乾燥して、本発明の複合微生物製剤が得られる。

【0029】上記の方法で通常、各微生物の最終菌数は 10^4 cfu/g以上、好ましくは 10^{6-8} cfu/gになるが、いずれかの微生物の菌数が所望のレベルまで行かない場合は、その菌の純粋培養物を前述の方法で調製して追加混合し補充してもよい。

【0030】いずれの方法においても、微生物の吸着基材は少なくともカルシウム含有基材を含んでいることが

必要である。本発明の方法で使用できるカルシウム含有基材およびその他の基材としては、前記のものが挙げられる。この方法において、該カルシウム含有基材に含まれるカルシウムの少なくとも一部が微生物群の培養発酵過程で前述の生体適合型有機カルシウム化合物に変換される。この生体適合型有機カルシウム化合物が、本発明で使用する複合微生物群の示す後述する種々の生理活性を増強するものと推測される。

【0031】

【作用】本発明の複合微生物製剤は、後述するように種々の有益な生理作用を示すので医薬用途として使用することができる。その場合、本発明の複合微生物製剤はそのまま投与することもできるが、種々の経口投与用剤形にして投与することもできる。例えば、顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤などのように医薬組成物として用いられる形状にすることもできる。その場合、本発明の複合微生物製剤に通常の医薬に用いられる構成成分を混合し製剤化することができる。医薬用構成成分としては、例えば顆粒剤の場合、乳糖、炭酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、蔗糖、マンニトール、デンプン、結晶性セルロース、硫酸カルシウム、沈降炭酸カルシウム、リン酸カルシウムなどの賦形剤、デンプン、結晶性セルロースなどの崩壊剤、10～20%アラビアゴム水溶液、5～10%デンプン糊液、PVPの5～10%水溶液またはエタノール溶液、セルロース誘導体の1～2%水溶液あるいはエタノール溶液などの結合剤が挙げられる。錠剤の場合は、乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶性セルロースなどの賦形剤、5～10%デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、カルボキシメチルセルロース液、アラビアゴム液、ゼラチン液、ブドウ糖液、白糖液、トラガント液、アルギン酸ナトリウムなどの結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、精製タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウムなどの滑沢剤などが挙げられる。また、丸剤およびカプセル剤では上記の賦形剤、結合剤などの他にコーティング剤が構成成分として挙げられる。コーティング剤としては、丸剤では白糖、デンプン、タルクなどが、カプセル剤ではゼラチン、グリセリン、ソルビトールなどが挙げられる。これらの組成物は、通常の動物用医薬品製造の方法によって製造することができる。また、必要に応じて通常の酸化防止剤などの安定化剤を配合してもよい。

【0032】また、本発明の複合微生物製剤は糞便の悪臭低減作用およびその堆肥化促進作用、反芻動物のルーメン内メタン発生抑制作用を有するので、上記の医薬用途のほかには家畜用飼料添加物として使用することもできる。飼料用として使用する場合、本発明の複合微生物製剤をそのまま家畜に給与することもできるが、飼料用基材と混合して給与することもできる。飼料用基材としては、通常飼料として用いられるトウモロコシや、大麦、

小麦、ライ麦およびえん麦などの麦類、ふすま、糠などの糟糠類、大豆粕などの油粕類、ルーサンミール、小麦粉などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。その場合の形状も限定的ではなく、粉状、ペレット状などの通常の飼料の形状にすることができる。成形については、通常の配合飼料や混合飼料の製造に用いられる方法と同様の方法で製造することができる。製造方法については、例えば、チクサン出版社刊、「配合飼料講座（下巻）」、15～27頁に記載されている。

【0033】本発明の複合微生物製剤は、前述したように通常経口投与で給与することができる。投与量はヒトおよび牛、豚などの家畜の場合は通常3～8g/日が適量である。また、小動物の場合は、摂取食餌量の0.05～0.2重量%を給与することができる。

【0034】

【実施例】

実施例1（本発明の製剤の製造例）

本発明の複合微生物製剤は以下のようにして調製した。構成微生物はそれぞれ西日本及び北日本地域の褐色森林土壌から単離した。単離方法は前述の分離培地を用いて以下の方法によって行った。すなわち、バチルス属菌はPEES培地（栄研化学（株）製）を用いて、ラクトバチルス属菌はLBS選択寒天培地（Becton Dickinson Co. Ltd., (BBL) 製及びTOS寒天培地（前述）を用いて、ストレプトコッカス属菌はKFストレプトコッカス寒天培地（前述）を用いて、クロストリジウム属菌はNNクロストリジウム選択寒天培地を用いて、酵母（サッカロミセス属菌およびカンディダ属菌）はポテトデキストロース（PD）寒天培地（前述）を用いて単離した。培養条件は、ストレプトコッカス属細菌、バチルス属細菌、ラクトバチルス属細菌およびサッカロミセス属菌（酵母）、カンディダ属菌は好気的条件下で、クロストリジウム属細菌は嫌気的条件下で、37℃で培養を行った。また、ニトロソモナス属菌およびニトロソバクター属菌は前述の硝化細菌選択分離培地を用いて、好気条件下37℃で培養し単離した。また、硫黄細菌は前述のDSM120変法培地を用いて嫌気条件下40～45℃で培養し単離した。それぞれ分離培養後、ミニテック細菌同定システム（Becton Dickinson Co. Ltd., (BBL) 製、米国）、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bactriology）第8版、駒形和男編：微生物分類実験法、学会出版センター刊（1982年）および中野益男：化学と生物、第18巻、第15～24頁、学会出版センター発行（1980年）に記載の細胞膜化学構造による化学分類法および顕微鏡観察により同定した。その結果、以下の最近を分離同定した。即ち、バチルス・スプチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス・ナットー（*bacillus natto*）、バチルス・メガテリウム（*bacillus megaterium*）、ラクトバチルス・アシ

ドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*)、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*)、カンディダ・ユティリス (*Candida utilis*)、ニトロソモナス・オイロパエ (*Nitrosomonas europaea*)、ニトロバクター・ウイノグラディスキー (*Nitrobacter winogradskyi*)、スルフォロバス・アシドカルダリウス (*Sulfolobus acidocaldarius*) を同定した。

【0035】同定した構成微生物のコロニーを分離しそれぞれ液体純粋培養した。ストレプトコッカス属細菌、バチルス属細菌、ラクトバチルス属細菌、サッカロミセス属菌およびカンディダ属菌は好氣的条件下で、クロストリジウム属細菌は嫌氣的条件下で前述のニュートリエントブロス (Nutrient broth) 培地とDSM1ブロス

(DSM1 broth) 培地を用いて、37℃で対数増殖期まで培養を行った。また、硝化菌 (ニトロソモナス属細菌、ニトロバクター属細菌) は前述の硝化菌培養培地を用いて好気条件下37℃で12~24時間培養した。硫黄細菌は前述のDSM120変法培地を用いて嫌気条件下40~45℃で4~6週間培養した。得られた各微生物の純粋培養物から連続遠心によりそれぞれ集菌した後、リン酸緩衝液で洗浄し凍結乾燥した。

【0036】次に、凍結乾燥した各菌体5mgを前述のミネラル水1mlにそれぞれ懸濁したものを殺菌した100メッシュの米ヌカ粉体1kgに接種し、これに前述の酵素液2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で48時間好気条件下で静置発酵した。発酵温度が65℃まで上昇した後攪拌し、以後24時間毎に攪拌して5日間培養し、硝化菌と硫黄細菌を含む上記17種の細菌からなる複合微生物の元菌 (識別番号: EG) を得た (工業技術院生命工学工業技術研究所寄託拒否により自己寄託)。この元菌1kgに対しカルシウム含有基材として貝化石70重量%および米ヌカ30重量%を含む基材60kgを混合し、前述の酵素液2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で24時間静置発酵させる。発酵終了後攪拌し、12時間さらに発酵させ、発酵温度が60℃に上昇してから水分12%以下に低温冷風乾燥して本発明の複合微生物製剤を得た (製剤1)。

【0037】一方、硝化細菌と硫黄細菌を含まない本発明の複合微生物を調製した。即ち、前記の方法で調製した複合微生物の元菌から下記の13種の細菌を分離した。分離は、バチルス・スプチリス (*Bacillus subtili*

s)、バチルス・ナットー (*bacillus natto*)、バチルス・メガテリウム (*bacillus megaterium*) はPEES培地 (栄研化学 (株) 製) を用いて、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) はLBS選択寒天培地 (Becton Dickinson Co. Ltd., (BBL) 製) を用いて、ストレプトコッカス・フェーカリス (*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ラクチス (*Streptococcus lactis*)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) はKFストレプトコッカス寒天培地を用いて、クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) はNNクロストリジウム選択寒天培地を用いて、サッカロミセス・セレビシイ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびカンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) はポテトデキストロース寒天培地を用いて単離した。培養条件は、ストレプトコッカス属細菌、バチルス属細菌およびラクトバチルス属細菌、サッカロミセス属菌 (酵母)、カンディダ属菌は好氣的条件下で、クロストリジウム属細菌は嫌氣的条件下で、37℃で培養を行った。培養後、前述の同定方法でそれぞれ同定確認した。同定した構成微生物のコロニーを分離しそれぞれ液体純粋培養した。ストレプトコッカス属細菌、バチルス属細菌、ラクトバチルス属細菌、サッカロミセス属菌およびカンディダ属菌は好氣的条件下で、クロストリジウム属細菌は嫌氣的条件下で前述のニュートリエントブロス (Nutrient broth) 培地とDSM1ブロス (DSM1 broth) 培地を用いて、37℃で対数増殖期まで培養を行った。得られた各微生物の純粋培養物から連続遠心によりそれぞれ集菌した後、リン酸緩衝液で洗浄し凍結乾燥した。

【0038】得られた各細菌の凍結乾燥菌体を表1に示す培地を用いて25℃で24時間通気嫌氣的条件下で培養した後、同じ培地でスケールアップしてさらに25℃で培養することによって増殖した。得られた培養物から連続遠心により集菌し、前記と同様の方法でミネラル水1mlに懸濁し、これを米ヌカ粉体1kgに接種し、これに前記の酵素液2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で48時間好氣的条件下で静置発酵した。発酵温度が65℃まで上昇した後攪拌し、以後24時間毎に攪拌して5日間培養する。この培養物1kgに対しカルシウム含有基材として貝化石70重量%および米ヌカ30重量%を含む基材60kgを混合し、前述の酵素液2重量%、廃糖蜜5重量%、ミネラル水30重量%を加え、38℃で24時間静置発酵させる。発酵終了後攪拌し、12時間さらに発酵させ、発酵温度が60℃に上昇してから水分12%以下に低温冷風乾燥して本発明の複合微生物製剤を得た (製剤2)。

【0039】実施例2、3及び比較例1、2 (血中コ

レステロール低下作用)

日本クレア社(東京)から購入したF344雄ラットに1%コレステロール含有高脂肪飼料(表2)を4週間与え、高コレステロールラットを得た。なお、供試ラットには試験中自由摂餌摂水させた。

【0040】このようにして得たラット(8週齢)を8頭ずつ2群に分け、一方には実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤2)15%を含む高コレステロール含有飼料を給与し(実施例2)、他方には15%の米ぬかを含有する高コレステロール含有飼料を給与した(比較例1)。また、別の同じ供試ラット群から10頭選び、5頭ずつ2群に分けて、一方には実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤2)15%を含む基本飼料(表2)を給与し(実施例3)、他方には15%の米ぬかを含有する基本飼料を給与した(比較例2)。給与は8週間行い、排泄した糞を1週間おきに24時間分を回収した。また、週に一度ラットを固定しないで頸静脈から採血し、抗凝固剤入り遠心チューブに入れ遠心分離して血清試料を得た。8週間後、供試ラットをエー*

(給与飼料組成)

成 分	高コレステロール飼料	基本飼料 (g/kg飼料)
カゼイン	206	250
ショ糖	535	648
ビタミン混合物 ¹⁾	10	12
ミネラル混合物 ²⁾	33	40
コーン油	—	50
パーム油	206	—
コレステロール	10	—

注: 1)、2) American Institute of Nutrition. (1977). Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. Journal of Nutrition 107, 1340-1348. に記載のAIN-76の処方により調製する。

【0044】実施例4、比較例3 (整腸作用)
整腸作用を示す指標として、糞中の大腸菌に対する有用細菌の比率を調べた。即ち、実施例3及び比較例2で集めたラット糞便中の細菌数を測定し比較した。糞便中の細菌数は以下のようにして測定した。大腸菌(*Escherichia coli*)及びストレプトコッカスは腸内に常在する細菌であり、これらは糞便試料をデスオキシコレート寒天培地およびKFストレプトコッカス寒天培地(米国ベクトンディキンソン社製)をそれぞれ用いて37℃で2日間培養しコロニー数を計測した。腸内細菌として有用な細菌としては、ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属細菌、ユウバクテリウム(*Eubacterium*)属細菌、およびラクトバチルス(*Lactobacillus*)属細菌などの乳酸菌について糞便試料をBS寒天培地、ES寒天培地及びLBS寒天培地(米国ベクトンディキンソン社製)を用いてガスバック法によりそれぞれ37℃で5日間培養した後、コロニー数を計測した。得られたコロニー数から大腸菌に対するその他の細菌の比率を求め経時的に示

* テル麻酔により殺し、肝臓を摘出し、0.9%生理食塩水で洗浄した後、秤量し凍結保存した。

【0041】血清試料中の総コレステロール含量を市販の測定キット(米国アボット社製、TDXシステム分析キット)を用いて測定した。また、肝臓中の中性ステロール類を、摘出肝臓試料から全脂質をクロロホルム-メタノール混合溶媒(容量比2:1)で抽出した後、松原ら(Agricultural and Biological Chemistry 54巻、1143~1148頁、1990年)の方法でアセチル化しガスクロマトグラフィー(島津製作所製、Shimadzu 14A GLC)で分析定量した。

【0042】結果を図1、2及び3に示す。図3において斜線は本発明の製剤投与群のデータを示し、黒印は対照群のデータを示す。投与群と非投与群の測定データはスチューデントt検定で有意差を検定した。結果から明らかに本発明の複合微生物製剤は血中のコレステロール値を有意に下げる作用があることがわかる。

【0043】

【表2】

した(図4)。図4から明らかに本発明の複合微生物製剤投与群(実施例4)は、対照群(比較例3)に比較して整腸作用に有用とされる乳酸菌およびビフィダス菌の増殖を助長する作用があると考えられる。

【0045】実施例5、比較例4 (制癌作用)

本発明の複合微生物製剤の制癌作用は、ヌードマウスを用いて評価した。なお、制癌作用については本発明の微生物の細胞膜物質が作用していると推測されこと及びヌードマウスに生菌剤を投与することによる影響を排除する理由で、本発明の複合微生物製剤はその菌体成分を投与して行った。菌体成分は以下の方法で調製した。

【0046】実施例1で調製した複合微生物(製剤2)の培養菌体を集菌しクロロホルム-メタノール(1:2)混液で3回抽出し脱脂した。脱脂菌体はアスピレーターで溶媒を除去した後、脱脂菌体60mgに対し、1mlの割合で超純水に懸濁し、同量の80%フェノールを加えて75℃の水浴中で加温、60~70℃に達してから5分間攪拌し、速やかに氷浴中で10℃まで冷却し

た。これを2000rpm、60分間遠心分離し、水層とフェノール層に分けた。フェノール層はさらに同量の超純水を加えて上記の操作を繰り返した。得られた水層は超純水に対して48時間透析後、適量まで減圧濃縮した。濃縮された水層に0.1M Tris-HCl 緩衝液(pH7.8)を等量加えた。次にRNase 2mg及びDNase 3mgを添加し、37℃で24時間酵素処理をして結合した核酸を分離した。この酵素処理液を適量まで濃縮し、等量の80%フェノールを加え、40分間4℃で攪拌後、2000rpm、60分間遠心分離し得られた水層を超純水に対して4℃で48時間透析後、凍結乾燥し、粗菌体成分を得た。粗菌体成分を0.01%アジ化ナトリウムを含む0.2M酢酸アンモニウム緩衝液に溶かしセファロース6Bカラム(ファーマシア社製)(分画可能範囲:分子量 $10^4 \sim 10^6$)に充填し、溶出速度9ml/時間で6mlずつ分画し精製した。

【0047】ヌードマウスは近交系BALB/c(nu/nu)、4~5週齢のものを使用した。このヌードマウスにヒト由来のヌードマウス可移植性腫瘍であるヒト原発性肝癌PLC-303Hepatoma細胞を移植した。移植は無菌的に行い、2~3mm角に細切した腫瘍片をヌードマウス左右腋窩部皮下へ移植して投与実験を行った。

【0048】投与は、上記菌体成分を生理食塩水で1mg/mlの濃度に溶解したものをバイアル瓶にとり、オートクレイブで高压滅菌したものを使用した(実施例5)。対照群(比較例4)には同様にして滅菌した生理食塩水を投与した。投与方法は腫瘍移植日を0日目として36日目まで1日1回腹腔内投与した。移植0日目より4日間隔でマウスの体重と腫瘍の大きさを計測した。腫瘍の大きさはノギスを用いて長径と短径を測定し、次式、腫瘍体積=(長径×短径)²×1/2により腫瘍体積を算出した。移植0日目の腫瘍体積を1.0とし、それに対する腫瘍体積の比率を求めた。移植36日目の菌体成分投与群(実施例5)と対照群(比較例4)の腫瘍体積率を図5に示す。図5から明らかなように対照群の腫瘍体積は移植時から変化していないが、本発明の微生物製剤の菌体成分投与群(実施例5)では腫瘍体積が半以下に縮小した。この差異はスチューデントt検定で有意差が認められた。なお、試験中のマウスの体重には変化は認められなかった。

【0049】実施例6、比較例5 (免疫賦活化作用) 実施例5及び比較例4と同様の方法でヌードマウスに癌細胞片を移植し、本発明の微生物群の菌体成分(実施例6)及び生理食塩水(比較例5)を投与した。移植36日目に以下の方法でマウス腹腔マクロファージの活性を測定した。マクロファージ活性化の指標として、パーオキシダーゼ-抗パーオキシダーゼ可溶性複合体(PAP)を標識免疫複合体としてマウス腹腔マクロファージを反応させ、その取り込み量を酵素免疫定量法の原理により微量定量した。

【0050】すなわち、マウスをエーテル麻酔し、70%エーテル綿で腹壁を消毒する。冷HBSS-(ハンクス平衡塩液:Hank's Balanced Salt Solution)を5~6mlシリンジに取り、下腹部中央の腹筋部分より腹腔内に急速に注入する。70%エタノール綿で30秒間腹壁をマッサージした後、シリンジで腹腔滲出細胞(PEC)を含むHBSS-を回収する。これをポリプロピレン製遠心チューブに移し、1000rpmで1分間、4℃遠心分離によりHBSS-で2回洗浄した後10%ウシ胎児血清(FBS)-10mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(以下、HEPESと略称する)を含むRPMI1640培地に懸濁して6穴平底プラスチックシャーレに分注し、5%炭酸ガスインキュベーター内で37℃、60分間培養する。培養後、シャーレをよく振盪し非付着細胞を浮遊させ、吸引除去する。同様に温HBSS-で3回洗浄後、2.5mM EDTA-生理食塩水を2ml加え20分間氷冷後、付着細胞をラバーポリスマンで物理的に剥ぎ取り、再び遠心チューブで1000rpmで5分間、4℃で遠心洗浄後、血球計算盤を用いて 5×10^4 /mlとなるように10%FBS-10mMHEPESを含むRPMI1640培地に懸濁した。

【0051】このようにして調製したマクロファージ浮遊液を96穴平底マイクロプレートに200μlずつ3反復で分注し、37℃、5%炭酸ガスインキュベーターで一晩培養する。培養後、培養液を吸引除去し、ウシ血清アルブミン(BSA)含有HBSSで希釈したPAP溶液を各穴に100μl分注する。プレートには細胞は播き込まれているがPAPは分注されていないブランクの穴も用意する。このプレートを5%炭酸ガスインキュベーターで37℃、60分間保温し、免疫複合体と反応させる。反応後、各穴のPAP溶液を吸引除去し直ちに各穴を氷冷しておいた10mMHEPESを含むHBSSで洗浄する。洗浄の終わった穴からHBSSを吸引除去し、細胞溶解液として1%NP-40(乳化剤Nonidet-P-40)を含むリン酸緩衝食塩液(以下、NP40-D'PBSと略称する)を100μl分注する。分注したプレートから各穴当たり50μlずつ発色用プレートに移し、これに150μlの発色基質(2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzothiazoline sulfate])を0.2mg/mlの濃度でクエン酸-リン酸緩衝液に溶かし0.03%過酸化水素を使用直前に等量混合したもの)を各穴に加え、アルミホイルで遮光して室温で50分間放置した。各穴内の気泡をとるためプレートごと1000rpmで5分間遠心分離し、マイクロプレートリーダーにて波長405nmで吸光度を測定した。対照群のマクロファージ活性を1.0として本発明の微生物製剤投与群のマクロファージ活性を求めた。結果を図6に示す。結果から明かなように本発明の複合微生物製剤は非投与群に比較してスチューデントt検定で有意に活性が高かった。

【0052】実施例7、比較例6（血圧降下作用）
 高血圧自然発症ラットSHR/NCrj（日本チャールズブリバース社）を使用して本発明の複合微生物製剤の血圧降下作用を評価した。対照として正常血圧のウィスター系ラットWKY/NCrj（日本チャールズブリバース社）を使用した。動物はSPF環境下において室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50～60%、明暗周期14～10時間の長日周期にて1週間予備飼育した。動物を無作為に3群7匹に分け、実験に供した。1群は本発明の微生物製剤（製剤2）投与群（実施例7）、1群は非投与群（比較例6）、残りの1群は正常血圧ラットに非投与の対照群とした。同じ投与群の動物を同じケージに入れ排泄物で影響がないよう工夫した。実験前及び実験中は飼料（日本クレア社製CE2、オートクレーブ滅菌済み）と水を自由に摂取させた。複合微生物製剤の投与は生後6週齢より6週間にわたって行った。投与方法は経口ゾンデを用い、投与量はラット体重250g当たり飼料平均摂取量20gの3重量%を0.9%生理食塩水1.0ml/体重100gにて希釈して投与した。比較例と対照群は生理食塩水を上記と同じ容量投与した。投与は毎日午前10時から同じ個体順に行ったが、血圧測定日はゾンデ使用投与によるストレスの影響を除外するため測定後投与した。血圧測定は投与開始後週1回行った。測定は、ラット尾静脈より非観血式血圧測定NARCO, PE300（東海作理機製）を使用して行った。投与群と非投与群の測定データはスチューデントt検定で有意差を検定した。結果を図7に示す。図7から明らかなように本発明の複合微生物製剤は非投与群に比較して有意に血圧を低下させた。

【0053】実施例8（血糖値低下作用）
 実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤（製剤1）を5人の糖尿病患者（女性2名、男性3名、年齢構成45～53才）に投与した。投与は1990年4月に開始し、1日5gずつ経口投与を行った。血糖値は投与前の1988年7月、1989年7月及び投与開始後の1990年10月の3回、朝食時の食前、食後1時間後及び2時間後に採血し測定した。測定は、グルコースをヘキソキナーゼによりグルコース-6-リン酸（G-6-P）にし、G-6-PデヒドロゲナーゼによりNADPをNADPHに還元した後、波長334nmで紫外部の吸光度を測定する酵素法（ベルグマイヤー（Bergmeyer, H. U.）ら、酵素分析法（Methoden der enzymatischen Analyse）、第2版、第11巻、第1163～1165頁、フェアラーク・ヘミー（Verlag Chemie）発行（ヴァインハイム/ベルグシュトラッセ））により行い、5人の平均値を算出した。結果を図8に示す。結果から明らかなように、本発明の複合微生物製剤を投与すると血糖値が顕著に低下し正常値の範囲に入った。

【0054】実施例9（精神障害原因物質の腸内発生抑制）

腸内微生物のバランスがストレスなどにより崩壊すると腐敗菌が優勢となり、腐敗菌の活動によりアミン、アンモニア、フェノールや硫化水素、メルカプタンなどの硫黄化合物などいわゆる悪臭物質が発生し、これが肝臓を通して脳に入り、各種脳障害をもたらすと考えられている。即ち、ストレスなどによる精神障害の一因として腸内の悪臭物質の発生が考えられる。この悪臭物質を低減させると精神ストレスは急速に回復される。本発明の複合微生物製剤は腸内の悪臭物質の発生抑制作用を示す。このことを5人の腸内悪臭物質の発生抑制で確認した。即ち、任意に5人の神経症経歴のボランティアを選び、本発明の複合微生物製剤（製剤1）を1日一人5gずつ経口で服用させ、この投与直前及び投与後8日目、16日目、24日目に午前定時に検便チューブで5g採取し、バイアル瓶に移して37℃で24時間インキュベートした。バイアル瓶中のアンモニア濃度は日本工業規格JIS K0102 42に記載の方法およびケルダールの微量定量法で測定した。また、硫化水素、メチルメルカプタン、硫化メチルおよび二硫化メチルの硫黄化合物はガスクロマトグラフィーで測定し、5人のデータの平均値を求めグラフに示した（図9）。結果から明らかなように本発明の複合微生物製剤の投与により前記悪臭物質の発生が抑制された。また、悪臭物質の低減と共に症状も軽減した。

【0055】実施例10、比較例7（乳質改善）

1群5頭の乳牛に通常の飼料給与の加えて実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤（製剤2）5g/頭/日給与し、乳質に対する影響を調べた。対照として、別の牛群に実施例1で使用した微生物基材を同量与えて比較した。給与前1週間、給与時、給与後1、5、7、9、11、13、15、17週間後の搾乳した生乳100gを秤量し、凍結乾燥させて得られた粉末試料にクロロホルム-メタノール（2：1）混液約150mlを加えて30分間超音波処理した。これを吸引ろ過し、得られたろ液は分液ロートに移し、残渣には50mlクロロホルム-メタノール（2：1）混液を加え30分間超音波処理後、吸引ろ過してろ液を先の分液ロートに移した。この操作を再度行った。次に、分液ロート中のろ液に1/5量の1%BaCl₂を加えて振盪攪拌後、一晩暗所に放置してクロロホルム層と水層に分配した。得られたクロロホルム層を30℃の水浴中で減圧濃縮し全脂質を得た。これにクロロホルム-メタノール（2：1）混液を加え、200mg/ml濃度に溶解し、-20℃で保存した。得られた全脂質試料を脂肪酸メチルエステル化しガスクロマトグラフィー（島津製作所製、LC-6A）及びガスクロマトグラフィー質量分析計（島津製作所製、QP-1000）で分析し、全脂質含量、不飽和脂肪酸、飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸及びコレステロール含量を定量した。不飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸については飽和脂肪酸との比率を求めた。結果を図10～13に示す。図

10に示すように全脂質含量は対照群と差異がないが、飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸量、多価不飽和脂肪酸量は本発明の複合微生物製剤投与群では対照群に比較して上昇した(図11、12)。一方、コレステロール含量は逆に低下した(図13)。不飽和脂肪酸、多価不飽和脂肪酸は固まりにくい脂肪で動脈硬化の予防効果があるといわれており、本発明の複合微生物製剤の投与により、この脂肪酸組成が増加することが確認された。

【0056】実施例11、比較例8 (肉質改善)
249頭の褐毛雄牛に通常の飼料給与に加えて実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤1) 5g/頭/日給与し、肉質に対する影響を調べた。対照として、別の牛群290頭に実施例1で使用した基材を同量与えて比較した。肥育終了後、通常の屠殺により得られたカーカスから赤身及び白身をそれぞれ100gずつサンプリングし、実施例10と同様の方法で脂質の分析定量を行った。結果を図14~16に示す。図14に示すように、本発明の複合微生物製剤の投与によりコレステロールは赤身、白身ともに顕著に減少した。一方、不飽和脂肪酸、特に脳血栓の防止に有効なパルミトオレイン酸の含量が増加した。

【0057】実施例12、13、比較例9 (卵質改善)
1群250羽の採卵鶏3群を用意し、2群に実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤1)を給与飼料にそれぞれ0、3%及び1、0%混合したものを給与し、ステロール類含量に対する影響を調べた。対照として残りの1群には飼料に本発明の複合微生物製剤を添加しないで飼育しその卵質を比較した。投与群と非投与群の測定データはスチューデントt検定で有意差を検定した。結果を図17に示す。図17に示すように本発明の複合微生物製剤を給与することにより無添加と比較してステロール類の含量が有意に低減した。

【0058】実施例14 (生産性向上)
1群50頭の乳牛群に本発明の複合微生物製剤を投与する前及び投与後の牛群年間乳量を比較し乳生産に与える影響を調べた。試験は1989年に開始し、1989年及び1990年の2年間投与しないで年間乳量を記録し、1991年2月から継続して、実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤1)を1日5g/頭、通常の飼料に加えて投与し年間乳量を記録した。結果を図18に示す。図18から明らかなように、本発明の複合微生物製剤投与後、年間乳量は約6%増加した(1990年と1993年の比較)。

【0059】実施例15、比較例10 (魚脂質組成向上とコレステロール低減)

養殖魚ハマチに本発明の複合微生物製剤(製剤1)を投与し、その脂質に対する作用を調べた。1群3000尾のハマチに養殖用飼料にその0、2%量、実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤を添加して給与し、給与

開始日、開始後90日目、180日目にそれぞれ12尾ずつ捕らえ、腹側及び背側の肉および肝臓を取り、それぞれ実施例10と同様の方法で脂質の分析を行った。比較例として実施例1で使用した基材を同量給与して同様の試験を行った。投与群と非投与群の測定データはスチューデントt検定で有意差を検定した。結果を図19、20、21に示す。図19から明らかなように本発明の製剤投与により不飽和脂肪酸および多価不飽和脂肪酸の比率が有意に上昇し、図21に示すようにコレステロールの含量が有意に低下した。

【0060】実施例16、比較例11 (糞便の悪臭低減と堆肥化促進)

1群50頭の乳牛に通常の飼料給与に加えて実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤1) 5g/頭/日給与し、糞便の悪臭低減と堆肥化促進作用を調べた。対照として、別の牛群50頭に実施例1で使用した微生物製剤調製用基材を同量与えて比較した。牛舎には敷料としておが屑を敷いた。投与3週間後、牛舎の糞便をローダーで集め山積みし堆肥化させた。山積み直後から毎日堆肥温度、湿度、pHを測定した。堆肥は22日後、36日後、73日後の3回切り返しを行った。また、10日に一度堆肥をサンプリングし堆肥腐熟度の指標となるC/N比を高感度NC-アアナライザー、スミグラフモデルNC-80型(住友化学(株)販売)を用いて求めた。堆肥温度、湿度、pHの測定結果を図22に示す。また、C/N比を図23に示す。図22から明らかなように本発明の方が発酵温度が高く微生物の活性が高いことを示している。本発明の堆肥化促進作用はC/N比の急激な低下からも明らかである(図23)。

【0061】上記とは別に堆肥山積み時から8日後、16日後及び24日後に悪臭物質の測定を行った。測定は、アンモニアについては日本工業規格JIS K10242に記載の方法および環境庁告示第47号(平成元年)に準拠した方法で行い、硫化水素、メチルメルカプタンおよび硫化メチルについては炎光光度検出器(FPD)付ガスクロマトグラフィーを用いて測定した。結果を図24に示す。図24から明らかなように硫化水素、メチルメルカプタン、硫化メチルは顕著に減少し、アンモニアも約1/3に減少した。

【0062】実施例17、比較例12 (堆肥過程メタン発生抑制)

実施例16と同様の方法を繰り返して堆肥の山積みを行った。直後から経時的に発生するメタンの量を測定した。測定は、堆肥試料50mlを100ml容器(バイアル瓶)に入れて密栓し、37℃で24時間振盪加温後、気体部分を熱伝導度検出器(TCD)付ガスクロマトグラフィー分析により行った。結果を図25に示す。図から明らかなように、本発明の複合微生物製剤を投与した牛群の堆肥は非投与群に比較して顕著にメタン発生が少なかった。

【0063】実施例18、比較例13 (ルーメン内メタン発生抑制)

実施例16で本発明の複合微生物製剤を投与した乳牛のうち、6頭からルーメン(第1胃)内胃液(ルーメンジュース)を採取し、37℃でインキュベートし経時的に発生するメタン濃度を実施例17と同様の方法で測定した。結果を図26に示す。図から明らかなように、本発明の複合微生物製剤の投与によりルーメン内のメタン発生を抑制した。

【0064】実施例19、比較例14、15 (単一微生物との比較)

実施例1で調製した本発明の複合微生物製剤(製剤2)のコレステロール低減作用をラクトバチルス属細菌およびストレプトコッカス属細菌のそれぞれの作用と比較した。これらの菌はそれぞれコレステロール低下作用があると報告されている細菌である(グリルランドら、Applied and Environmental Microbiology 49, 377-381(1985); イシハラら、Intestinal bacteria on cholesterol metabolism、121-144(1989) Japan Scientific Press; スズキら、Animal Science and Technology 62, 565-571(1991))。ラクトバチルス属細菌としては、ラクトバチルス・アシドフィルス ATCC 11506 株(比較例14)を用い、ストレプトコッカス属細菌としてはストレプトコッカス・フェーカリス ATCC 14429 株を用いた(比較例15)。それぞれ、実施例1に記載の培地で培養し試験に供した。試験方法は、これらの供試料をそれぞれ使用する以外は実施例2と同じ方法で行った。結果を図27に示す。結果から明らかなように、本発明の複合微生物製剤はコレステロール低減作用を示す細菌単独よりも効果が高く複合微生物により相乗効果が得られた。

【0065】

【発明の効果】本発明の複合微生物製剤は、血中コレステロール降下作用、整腸作用、免疫賦活作用、制癌作用、血圧降下作用、高血糖値の低下正常化作用、精神障害原因物質の腸内生産抑制作用などの種々の生理作用、および家畜の生産性向上、家畜糞便の悪臭消臭作用とその堆肥化促進、更に反芻動物のルーメン内及び堆肥のメタン発生抑制などに非常に優れた効果を示す。

【0066】これらの効果については、本発明の複合微生物製剤に含まれるどの菌が働いているのか概ね示すことはできる。例えば、血中コレステロール降下作用には、バチルス・メガテリウム、ストレプトコッカス・フェーカリス、ストレプトコッカス・ラクチスが関与していると考えられる。また、整腸作用には主にラクトバチルス属菌が関与していると考えられる。また、免疫賦活作用にはバチルス属菌が関与していると考えられる。しかしながら、これらの細菌のみを使用しても得られるそれぞれの効果は、本発明の複合微生物製剤が示す効果よりも小さく、各作用に関与しないと思われる他の菌

との相乗作用が働いているものと推測される。また、吸着基材としてカルシウム含有基材を使用し微生物群とともに発酵させることでその作用が増強されていることが特徴である。

【図面の簡単な説明】

【図1】高コレステロール含有飼料給与ラットの血清コレステロール値の経時変化を比較した図である。

【図2】基本飼料給与ラットの血清コレステロール値の経時変化を比較した図である。

【図3】高コレステロール含有飼料給与および基本飼料給与ラットの肝臓中のコレステロール値を比較した図である。

【図4】ラット糞中の大腸菌数に対する有用乳酸菌数の比率の経時変化を比較した図である。

【図5】人為的に癌細胞を移植したヌードマウスに本発明の製剤を36日間投与した後の癌細胞の大きさを比較した図である。

【図6】人為的に癌細胞を移植したヌードマウスに本発明の製剤を36日間投与した後のマクロファージ活性を比較した図である。

【図7】高血圧自然発生ラットに本発明の製剤を投与した場合の血圧の経時変化を比較した図である。

【図8】糖尿病患者における本発明の製剤を投与前及び後の血糖値の変化を示す図である。

【図9】神経症患者における本発明の製剤を投与前及び後の糞中悪臭成分含量の変化を示す図である。

【図10】本発明の製剤給与による牛乳中の脂肪含量の経時変化を比較した図である。

【図11】本発明の製剤給与による牛乳中の飽和脂肪酸量に対する不飽和脂肪酸量の比率の経時変化を比較した図である。

【図12】本発明の製剤給与による牛乳中の飽和脂肪酸量に対する多価不飽和脂肪酸量の比率の経時変化を比較した図である。

【図13】本発明の製剤給与による牛乳中のコレステロール含量の経時変化を比較した図である。

【図14】本発明の製剤給与による牛肉中のコレステロール含量を比較した図である。

【図15】本発明の製剤給与による牛肉中のパルミトオレイン酸含量を比較した図である。

【図16】本発明の製剤給与による牛肉中の飽和脂肪酸量に対する不飽和脂肪酸量の比率を比較した図である。

【図17】本発明の製剤給与による鶏卵卵黄中のコレステロール含量の経時変化を比較した図である。

【図18】本発明の製剤給与前及び後の年間乳量の変化を示す図である。

【図19】本発明の製剤給与による養殖魚の飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸比率の変動を示す図である。

【図20】本発明の製剤給与による養殖魚の多価飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸比率の変動を示す図である。

【図21】本発明の製剤給与による養殖魚のコレステロール含量の変動を示す図である。

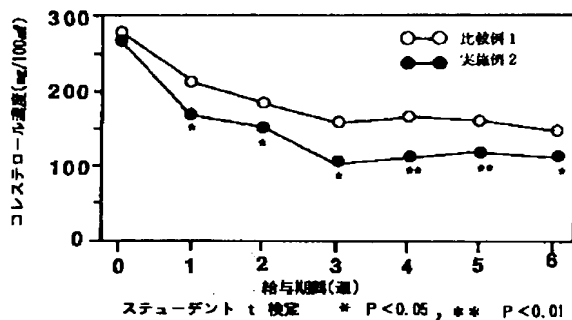
【図22】本発明の製剤を給与した乳牛の糞尿を堆肥化した場合の温度、湿度、pHの経時変化を示す図である。

【図23】本発明の製剤を給与した乳牛の糞尿を堆肥化した場合のC/N比の経時変化を非給与の場合と比較した図である。

【図24】本発明の製剤を給与した乳牛の糞尿を堆肥化した場合の悪臭成分含量の経時変化を示す図である。 * 10

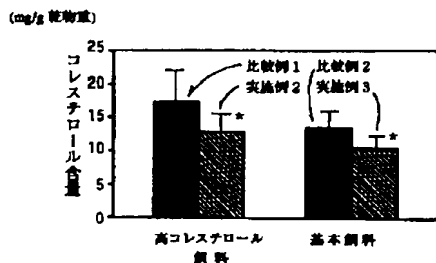
【図1】

(高コレステロール飼料給与ラットの血清コレステロール値)



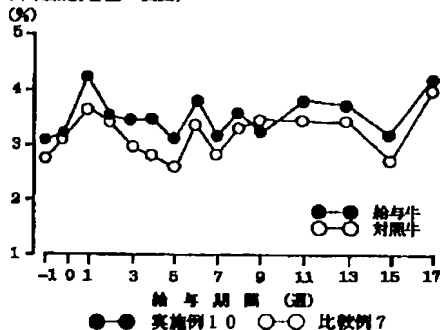
【図3】

(高コレステロール飼料及び基本飼料給与ラットの肝臓コレステロール)



【図10】

(牛乳脂肪含量の変動)



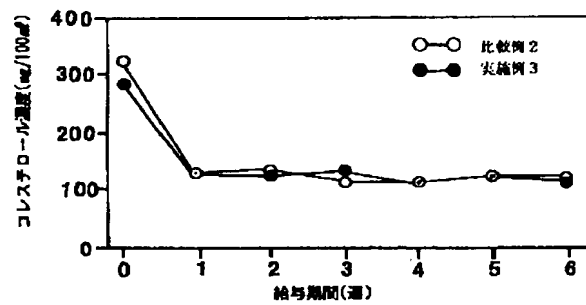
* 【図25】本発明の製剤を給与した乳牛の糞尿を堆肥化した場合のメタン発生量の経時変化を非給与の場合と比較した図である。

【図26】本発明の製剤を給与した乳牛のルーメン液のメタン発生量の経時変化を非給与の場合と比較した図である。

【図27】本発明の製剤を投与した場合のラットのコレステロール含量の経時変化をコレステロール低減作用を有する細菌単独を投与した場合と比較した図である。

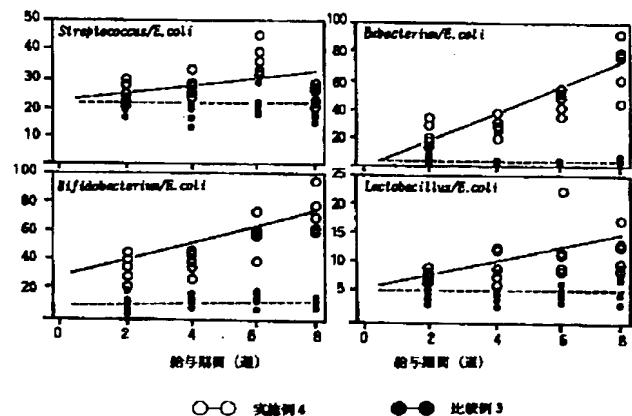
【図2】

(基本飼料給与ラットの血清コレステロール値)



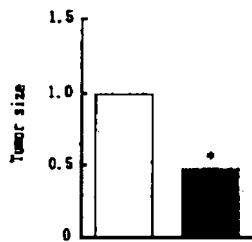
【図4】

(ラット糞中の乳酸菌/大腸菌比率)



【図5】

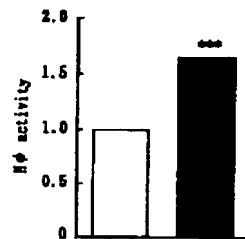
(癌組織の大きさの比較)



■ 実施例5 □ 比較例4

【図6】

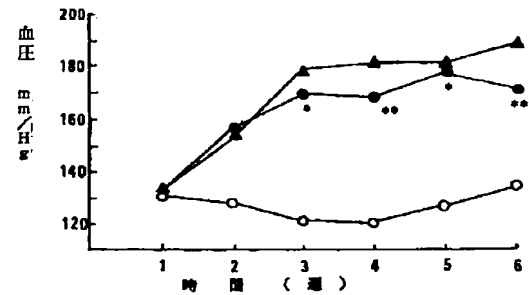
(マクロファージ活性の比較)



■ 実施例6 □ 比較例5

【図7】

(ラット血圧降下作用)



スチューデントt検定: *P<0.05 **P<0.01

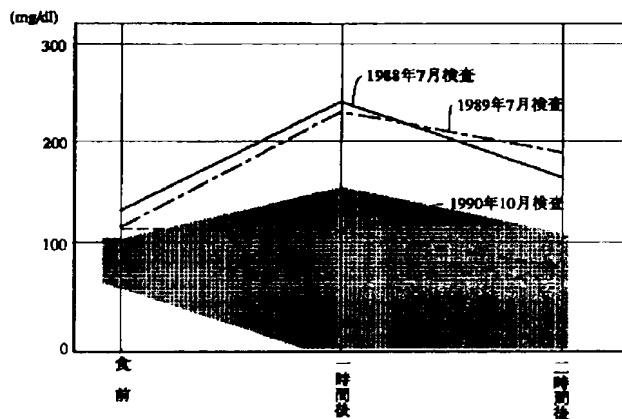
● 実施例5 (高血圧自然発生SHYラット)

▲ 比較例4 (高血圧自然発生SHYラット)

○ 対照 (ウイスター系正常血圧ラット)

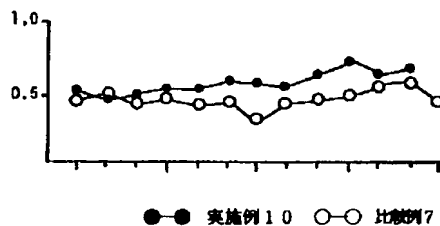
【図8】

(糖尿病患者血糖値の改善)



【図11】

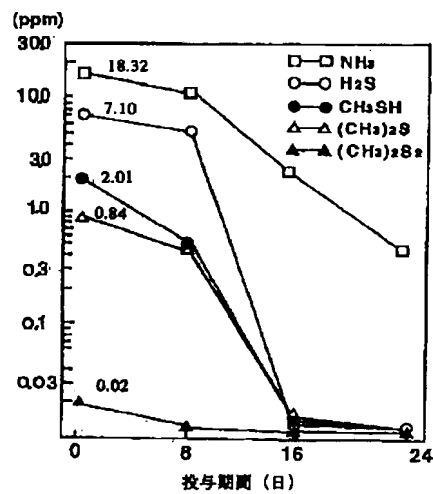
(牛乳中の不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比率の変動)



● 実施例10 ○ 比較例7

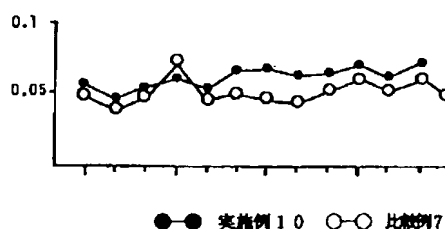
【図9】

(糞中の悪臭成分)



【図12】

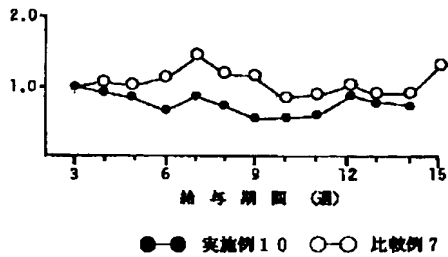
(牛乳中の多価不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比率の変動)



● 実施例10 ○ 比較例7

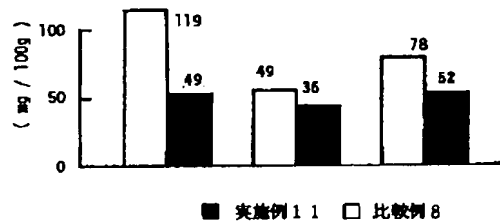
【図13】

(牛乳中のコレステロール含量の変動)



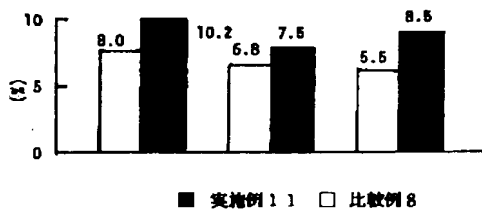
【図14】

(牛肉脂質のコレステロール含量の比較)



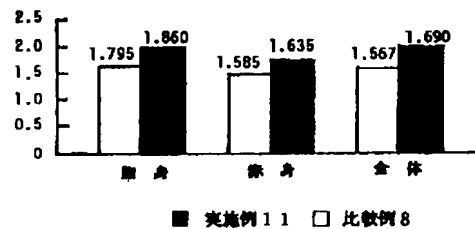
【図15】

(牛肉脂質のパルミトオレイン酸含量の比較)



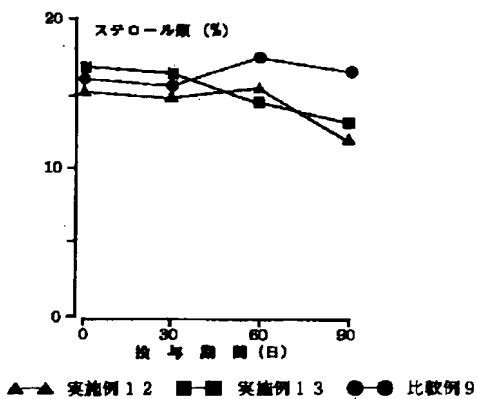
【図16】

(牛肉脂質の不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比率の比較)



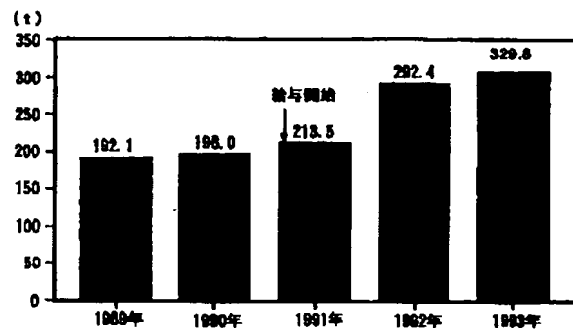
【図17】

(脂質中のコレステロールの変動)



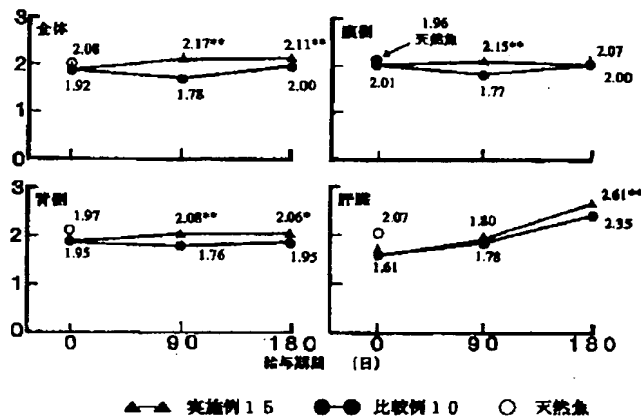
【図18】

(年間乳量の変動)



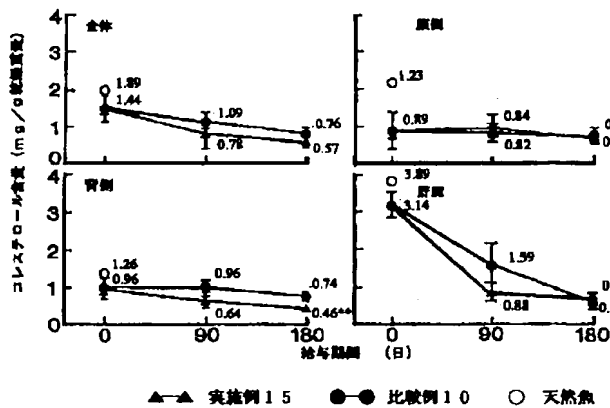
【図 19】

(養殖魚肉中の不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比率)



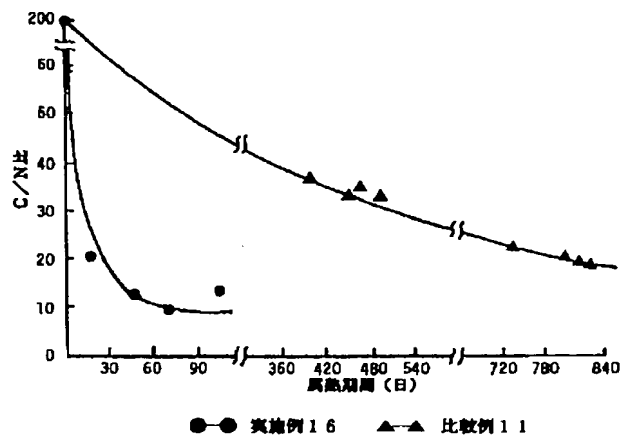
【図 21】

(養殖魚肉中のコレステロール含量)



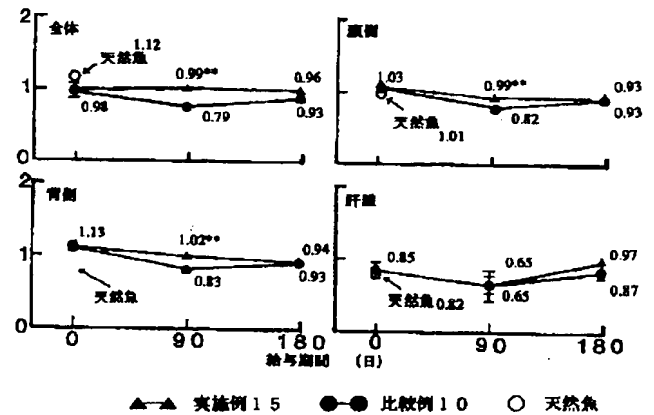
【図 23】

(乳牛糞尿堆肥化過程における C/N 比の変動)



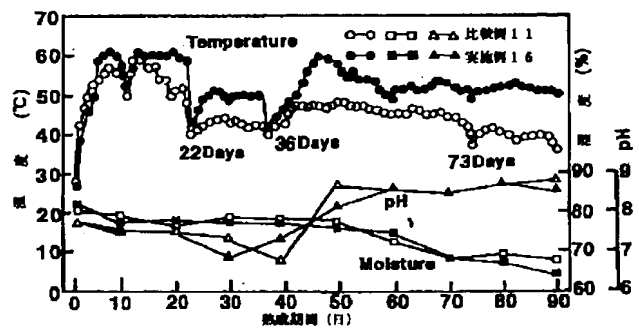
【図 20】

(養殖魚肉中の多価不飽和脂肪酸/飽和脂肪酸比率)



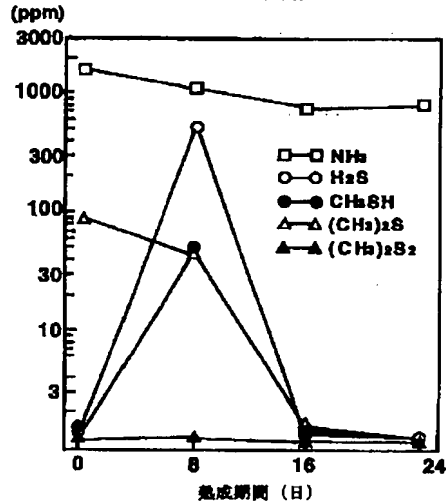
【図 22】

(乳牛堆肥の温度、pH、湿度の変動の比較)

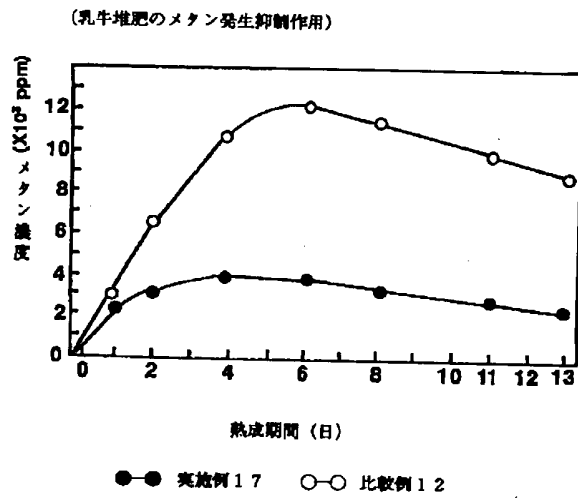


【図 24】

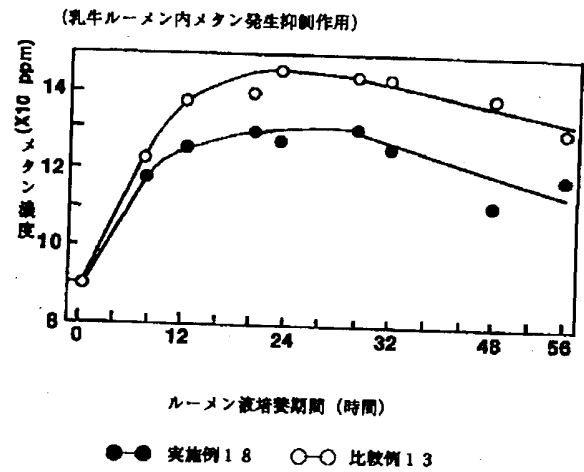
(乳牛堆肥の基質成分の変動)



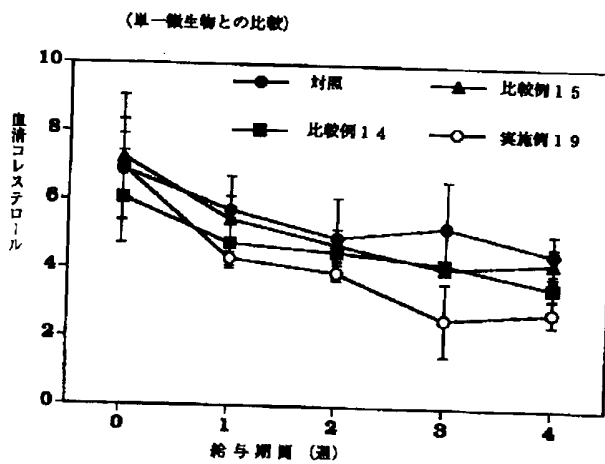
【図25】



【図26】



【図27】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

A 6 1 K 35/56
35/70
35/74

識別記号

ADN
ADU
AC J
ADQ
AEV
AEX
AFC

庁内整理番号

F I

A 6 1 K 35/56
35/70
35/74

技術表示箇所

ADN
ADU
AC J A
ADQ
AEV
AEX
AFC

// (C 1 2 N 1/20
C 1 2 R 1:125
1:11
1:23
1:25

1:24
1:245
1:46
1:145
1:865
1:72)